

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> : C12P 7/18 // (C12P 7/18 C12R 1:01, 1:145)		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 93/25696 (43) Date de publication internationale: 23 décembre 1993 (23.12.93)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00568 (22) Date de dépôt international: 14 juin 1993 (14.06.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/07212 15 juin 1992 (15.06.92) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université, F-75341 Paris Cédex 07 (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : BORIES, André [FR/FR]; 5, rue du Rec, F-11110 Armissan (FR). CLARET, Carole [FR/FR]; 4, chemin de la Gloriette, F-11110 Vinassan (FR).		(74) Mandataire: MICHELET, Alain; Cabinet Harlé & Phélip, 21, rue de La-Rochefoucauld, F-75009 Paris (FR). (81) Etats désignés: CA, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF PRODUCTS HAVING BACTERIAL ACTIVITY AND CAPABLE OF TRANSFORMING GLYCEROL INTO 1,3-PROPANEDIOL, CORRESPONDING STRAINS AND APPLICATION IN THE INDUSTRIAL PRODUCTION OF 1,3-PROPANEDIOL (54) Titre: PROCÉDE POUR L'OBTENTION DE PRODUITS A ACTIVITE BACTERIENNE, CAPABLES DE TRANSFORMER LE GLYCEROL EN 1,3-PROPANEDIOL, SOUCHES CORRESPONDANTES ET APPLICATION A LA PRODUCTION INDUSTRIELLE DE 1,3-PROPANEDIOL (57) Abstract <p>Process for the production of products having bacterial activity and capable of converting glycerol into 1,3-propanediol. The invention consists in firstly producing bacterial strains or species which ferment glycerol from anaerobic microbial habitats present in nature and enriching by discontinuous fermentation said precultures. The products having bacterial activity are then isolated used to convert glycerol by fermentation into 1,3-propanediol. The invention is characterized in that the conversion results in high yield and in that the biosynthesis of 1,3-propanediol prevents the formation of a large number of by-products.</p> (57) Abrégé <p>Procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol. L'invention consiste à obtenir d'abord des souches ou espèces bactériennes fermentant le glycérol à partir d'habitats microbiens anaérobies présents dans la nature. A partir des précultures actives, on réalise une étape d'enrichissement en fermentation discontinue, puis on isole les produits à activité bactérienne pour effectuer la conversion du glycérol par fermentation en 1,3-propanediol. Le rendement de la conversion est élevé et la biosynthèse du 1,3-propanediol évite la formation d'un nombre élevé de sous-produits.</p> <p>No English</p>			

**UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BB	Barbade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BJ	Bénin	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Brazil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République Centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CJ	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TG	Togo
DE	Allemagne	MG	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol, souches correspondantes et application à la production industrielle de 1,3-propanediol.

5 La présente invention concerne la production de 1,3- propanediol par fermentation de glycérol . Elle a plus particulièrement pour objet l'obtention de produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3- propanediol et leur application à la production industrielle de 1,3- propanediol . Les produits à activité bactérienne obtenus selon l'invention sont des populations microbiennes représentées par des écosystèmes anaérobies de digesteurs de résidus agro-industriels, de sédiments et de boues, ou de nouvelles souches pures issues de ces milieux . Parmi ces dernières , on peut notamment citer : Enterobacter agglomerans, biogroupe V et Clostridium butyricum .

20 L'invention a encore pour objet la production industrielle de 1,3-propanediol à partir de glycérol de co-produits et résidus de transformation de matières d'origine végétale ou animale, et en particulier les co-produits de distillation d'alcool d'origine agricole (éthanol industriel ou bioéthanol, alcools de bouche et eaux de vie , et substances analogues).

30 Le 1,3-propanediol ou triméthylèneglycol est un produit de base pour la synthèse des polyuréthanes et des polyesters , qui se substitue avantageusement aux matières premières actuellement utilisées, comme l'éthylèneglycol, le 1,2-propanediol et le 1,4-butanediol, grâce aux caractéristiques qu'il confère

aux produits obtenus: résistance des fibres ,  
élasticité, résistance à la lumière, à la corrosion,  
... Il s'utilise également comme additif dans la  
préparation de produits agro-alimentaires, et  
5 pharmaceutiques ( agent humectant par exemple ) dans  
les aliments pour animaux, le tabac, les préparations  
pharmaceutiques ....

La synthèse chimique de 1,3-propanediol  
s'effectue à partir de l'acroléine, matière très  
10 toxique , et issue de sources fossiles . Elle  
nécessite plusieurs étapes : déshydratation en  
hydroxypropanal puis hydrogénation catalytique,  
mettant en oeuvre des réactions délicates à réaliser  
et dont les principaux inconvénients sont les risques  
15 dûs à l'acroléine et aux produits secondaires, les  
conditions strictes de synthèse , la contamination  
éventuelle du produit fini par des substances  
toxiques, ce qui réduit les usages du 1,3-propanediol.

La formation de 1,3-propanediol a été mise en  
20 évidence ces dernières années chez quelques bactéries  
anaérobies facultatives et strictes, se développant à  
partir de glycérol comme substrat carboné . Mais le  
nombre de bactéries produisant du 1,3-propanediol et  
les connaissances sur les conditions de production  
25 sont encore restreints. En effet, seulement trois  
genres principaux sont connus : Clostridium,  
Klebsiella, Citrobacter, choix réduit qui limite les  
possibilités d'amélioration de la production.

Les premiers travaux relatant la formation  
30 microbienne de 1,3-propanediol ont été présentés par  
Magazanik et col., 1954 , (J. Bacteriol., 66, 611-  
619), chez Klebsiella pneumoniae , bactérie anaérobie  
facultative . La voie métabolique de biosynthèse du

1,3-propanediol a été ultérieurement caractérisée par Forage et Foster, 1982, ( J. Bacteriol., 149, 413-419 ) , et elle comprend deux étapes enzymatiques effectuées par une glycéról-déshydratase à coenzyme B12 dépendante et une 1,3-propanediol oxydoréductase à NAD . Le rendement de conversion du glycéról comme monosubstrat en 1,3- propanediol est chez cette bactérie d'environ 40-45 % ( poids/ poids) . Les autres produits formés par la bactérie à partir du glycéról sont : l'acétate, le lactate, l'éthanol, le 2,3- butanediol.

Dans le genre *Citrobacter*, une espèce a été décrite comme formant du 1,3-propanediol ; *Citrobacter freundii* (Homann et col., 1990, Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 121-126). Le rendement de conversion à partir de glycéról comme monosubstrat est proche de 50% ( poids/poids) , avec formation prépondérante d'acétate comme principal co-produit fermentaire, ainsi que des produits secondaires comme l'éthanol et le lactate . A la connaissance du demandeur , les seuls micro-organismes anaérobies stricts cités dans la littérature fermentant le glycéról en 1,3-propanediol appartiennent au genre *Clostridium* et les espèces sont : *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butylicum*, *C. butyricum*, *C. kantonoi*.

Comme document illustrant l'état de la technique dans le domaine de l'invention, on peut également citer la demande de brevet EP-A-0 361.082 qui décrit un procédé de sélection de souches bactériennes disponibles, en particulier dans des collections de cultures, pour leur aptitude à transformer le glycéról en 1,3-propanediol. Selon ce procédé, on réalise une fermentation dans des

conditions habituelles, en présence d'une des souches à sélectionner, d'une solution de glycérine à 5% comme seule source de carbone. On sélectionne les souches qui procurent le meilleur rendement de transformation en 1,3- propanediol.

On connaît aussi un procédé de sélection de souches à partir d'échantillons de paille en décomposition et de compost . Néanmoins ce procédé décrit par Biebl et al. (1991, Appl. Microb. Biol., 36, n°5, 592-597) présente l'inconvénient notable de nécessiter une pasteurisation des échantillons avant leur mise en culture . Seuls les microorganismes sporulés survivent à cette opération tandis que de nombreux genres , tels que Citrobacter et Klebsiella, sont détruits .

Ce procédé élimine ainsi avant l'étape de sélection des micro-organismes pouvant présenter des caractéristiques intéressantes . Il est donc très spécifique et ne permet la sélection que dans une gamme restreinte de micro-organismes.

On notera de plus que ce document ne mentionne l'isolement de souches qu'à partir d'habitats , tels que de la paille en décomposition ou du compost, où les organismes sont en présence d'air et non à partir d'habitats anaérobies.

A partir de glycérol comme seul substrat carboné, la voie fermentaire chez Clostridium conduit respectivement à :

- la synthèse de 1,3-propanediol , voie assurant la régénération des coenzymes réduits (NADH),
- la formation de métabolites : butyrate, acétate, éthanol, butanol, acétone, dioxyde de carbone

et hydrogène , en proportion variable selon les espèces et les conditions, mais qui résultent directement ou indirectement des voies obligées de production d'énergie (ATP) générant également les coenzymes réduits . Les tentatives d'apport de co-substrats carbonés, tels les oses, pour favoriser les voies de production d'énergie et orienter préférentiellement la synthèse du 1,3-propanediol à partir de glycérol, conduisent à l'accumulation de ces produits secondaires, facteurs potentiels d'inhibition des bactéries ( Biebl M., 1991, Appl. Microb. Biol., 35, 701-705).

Les conditions de mise en oeuvre de ces souches bactériennes, en cultures pures anaérobies, constituent des handicaps à l'échelle de la production de 1,3-propanediol en condition industrielle . Il est en effet indispensable d'opérer dans des conditions de stérilité pour éviter les contaminations, d'acclimater les souches aux milieux de production et d'adapter les compositions et paramètres des milieux . En outre , les produits de réaction sont sensibles aux inhibiteurs du milieu fermentaire, initialement présents ou formés.

L'invention concerne l'obtention de bactéries anaérobies facultatives et strictes fermentant le glycérol et la production de 1,3-propanediol par des espèces et des souches nouvellement décrites et obtenues, en cultures pures ou mixtes . Ce procédé est destiné à la production de 1,3- propanediol principalement à partir du glycérol contenu dans des substances issues de procédés industriels de transformation de matières d'origines végétales , ou de milieux à base de glycérol purifié.

Jusqu'à présent , à la connaissance du demandeur , aucun procédé de production de 1,3 propanediol n'a fait référence à des méthodes d'obtention, d'isolement et d'utilisation des souches microbiennes à partir d'habitats microbiens anaérobies. Le nombre restreint de souches de collection productrices de 1,3 propanediol entraîne des difficultés d'acclimatation des souches à des milieux aussi variés que ceux d'origine industrielle.

10        Sous un premier aspect, la présente invention a pour objet un procédé pour l'obtention de produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3- propanediol, ledit procédé comprenant les étapes de (a) préculture de populations  
15        anaérobies, issues d'habitats microbiens anaérobies, ladite préculture étant réalisée dans des conditions anaérobies sur milieu nutritif tamponné , contenant du glycérol comme seule source de carbone , (b) isolement des précultures microbiennes actives capables de  
20        fermenter le glycérol (c) enrichissement par fermentation discontinue desdites précultures dans un réacteur anaérobie , sur milieu nutritif à base de glycérol comme substrat et à pH régulé (d) isolement des produits à activité bactérienne capables de  
25        transformer le glycérol en 1,3-propanediol.

30        L'invention part de l'observation selon laquelle la fermentation du glycérol en 1,3-propanediol est une étape préalable principale de la dégradation qui prend place dans des écosystèmes anaérobies.

La présente invention consiste à obtenir des produits à activité bactérienne , et en particulier des souches pures bactériennes, fermentant le glycérol



à partir d'habitats microbiens anaérobies représentés par exemple par des digesteurs anaérobies, des sédiments de milieux naturels (sols, et autres ) et de boues de bassin de stockage d'effluents .

5            Selon l'invention, des précultures de populations anaérobies issues d'habitats microbiens anaérobies sont réalisées en conditions anaérobies sur milieu nutritif tamponné, à base de glycérol comme  
10           seule source de carbone et d'énergie, dans le but de favoriser le développement des souches capables de fermenter le glycérol. A partir des précultures actives , une phase d'enrichissement est effectuée en fermentation discontinue ( batch ) en réacteur anaérobie, sur milieu nutritif à base de glycérol  
15           comme substrat , et à pH régulé.

          Les conditions pratiques de pH varient selon la nature des microorganismes isolés . Des pH compris entre 5 et 8, et de préférence entre 6 et 7,5 se sont avérés les plus appropriés .

20           Durant la phase de consommation du glycérol par la culture enrichie en microorganismes fermentant le glycérol, l'isolement de souches bactériennes est opéré à partir de prélèvements en anaérobiose, et mettant en oeuvre une méthode de dilution des  
25           populations puis un étalement sur boîtes de Pétri selon une technique de simple ou double couche de milieu de culture gélosé , permettant de respecter les conditions anaérobies adaptées aux germes anaérobies facultatifs ou stricts.

30           La présente invention concerne les produits et bactéries ainsi obtenus, à partir de sources microbiennes anaérobies capables de produire du 1,3 propanediol, et qui appartiennent en particulier aux

espèces suivantes : Enterobacter agglomerans ,  
Clostridium butyricum, Citrobacter amalonaticus.

5        Sous un autre aspect, l'invention concerne également de nouvelles souches bactériennes identifiées par leur numéro de dépôt auprès de la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur ( CNCM), 25, rue du Docteur Roux ,PARIS, à savoir :

10       - la souche Enterobacter agglomerans, biogroupe V (souche PPDAF- INRA ) , déposée sous le N° I-1210 le 20 Mai 1992,

      - la souche Clostridium butyricum ( souche PPDAF- INRA), déposée sous le n° I-1211 le 20 Mai 1992,

15       - la souche Citrobacter amalonaticus ( souche GAF-INRA) déposée sous le n° I-1212 le 20 Mai 1992.

20       Sous encore un autre aspect de l'invention , le procédé de production de 1,3-propanediol comprend la mise en oeuvre des produits à activité bactérienne, que ce soit en cultures pures - en particulier des bactéries Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum - , ou en cultures mixtes d'écosystèmes anaérobies qui contiennent au moins une des espèces ou souches des bactéries : Enterobacter agglomerans ,  
25       Clostridium butyricum, Citrobacter amalonaticus.

30       Le procédé selon l'invention peut utiliser l'espèce bactérienne Enterobacter agglomerans et plus particulièrement la nouvelle souche Enterobacter agglomerans pour la production de 1,3-propanediol à partir de glycérol comme seule source de carbone assimilé, espèce nouvellement décrite pour sa capacité à fermenter le glycérol en 1,3-propanediol. La mise en oeuvre des souches Enterobacter agglomerans est

réalisée en conditions d'anaérobiose sur milieu de culture contenant du cobalt et en particulier sur milieu minéral additionné de 0,45 mg/l de cobalt et avec contrôle et régulation du pH entre 6 et 7,5 et de préférence à pH 7, dans une gamme de température située entre 28 et 40°C environ.

La nouvelle souche Enterobacter agglomerans se caractérise par un rendement de production de 1,3-propanediol d'au moins 74 mM pour 100 mM de glycérol consommé et une productivité volumique d'au moins 2 g de propanediol par litre et par heure en phase active de fermentation (glycérol à 2%). L'analyse du profil fermentaire révèle que la biosynthèse de 1,3-propanediol s'accompagne de la formation exclusive d'acide acétique comme co-métabolite majeur dosé dans la phase aqueuse, ce qui constitue un moyen de simplifier la phase de purification. La souche montre de plus un caractère gazogène peu élevé à partir de glycérol.

L'ensemble des caractéristiques relatives aux conditions et performances fermentaires du glycérol en 1,3-propanediol décrites ci-dessus : rendement très élevé, forte productivité, acétate comme seul co-produit accumulé, confèrent au procédé selon l'invention mettant en oeuvre l'espèce Enterobacter agglomerans et plus particulièrement la nouvelle souche Enterobacter agglomerans, des meilleures possibilités d'utilisation pour la production de propanediol à partir de glycérol comme source de carbone assimilable, en vue de l'application industrielle à des solutions de glycérol purifié ou contenu dans les eaux de procédés de transformation de matières organiques renouvelables.

Dans le procédé selon l'invention on peut également utiliser la nouvelle souche Clostridium butyricum, pour la production de propanediol à partir de glycérol présent dans des sous-produits d'origine agro-industrielle ou à partir de glycérol purifié, selon les conditions de fermentation suivantes :

- anaérobiose stricte - purge du milieu par flux d'azote, ajout de composés réducteurs ,
- pH régulé à des valeurs comprises entre 5 et 8 et de préférence entre 6 et 7,5,
- température : située entre 32 et 40°C, environ, notamment voisine de 37°C.

Le milieu de fermentation contient des éléments minéraux cofacteurs de l'extrait de levure et du glycérol à des concentrations comprises entre 15 et 200 g/l.

Il peut contenir en outre d'autres substances organiques soit non assimilées, soit capables d'être utilisées en tant que co-substrat.

Les rendements de conversion du glycérol en 1,3-propanediol obtenus sur milieu d'origine industrielle sont semblables à ceux déterminés en milieu synthétique : 64 % et 57% respectivement ( rendement molaire ).

Dans les conditions conformes à l'invention, la production de propanediol à partir de glycérol comme seul substrat carboné par Clostridium butyricum est réalisée pour une concentration initiale en glycérol allant jusqu'à 200 g/l, de préférence entre 65 et 180 g/l, avec une productivité volumique comprise entre 4,5 et 2,3 g de propanediol par litre de fermenteur et par heure , durant la phase active de fermentation.

Alors que les souches du genre Clostridium

fermentant le glycérol en 1,3-propanediol répertoriées dans la bibliographie produisent un grand nombre de sous-produits : acétate, butyrate , éthanol, lactate, ..., le procédé selon l'invention conduit à la formation d'un seul co-métabolite majeur , l'acide butyrique pouvant faciliter les opérations ultérieures de récupération du 1,3-propanediol.

Le procédé faisant l'objet de la présente invention peut mettre en oeuvre toute population microbienne anaérobie d'origine naturelle ou industrielle dans laquelle la présence de l'espèce Enterobacter agglomerans ou de Clostridium butyricum est démontrée.

Ce procédé de production de propanediol à partir des populations mixtes ainsi définies, permet une simplification de la mise en oeuvre des fermentations par diminution du risque de contamination.

La production de 1,3-propanediol est effectuée à pH compris entre 5 et 8, et de préférence entre 6,5 et 7, pour une concentration en glycérol comprise entre 20 et 125 g/l. A 37 °C , et à pH 6,5, le rendement optimal de conversion du glycérol en propanediol est de 66,7 %, lorsque la fermentation est réalisée avec 2% de glycérol. La plus forte productivité obtenue pour une culture à 50 g/l de glycérol est de 2,4 g/l/hr.

L'invention sera encore illustrée sans être aucunement limitée par les exemples qui suivent :

EXEMPLE 1:

Obtention et isolement de souches bactériennes à partir de flores microbiennes anaérobies fermentant le glycérol en 1,3-propanediol.

A partir d'une flore microbienne prélevée dans des habitats anaérobies tels les digesteurs anaérobies d'effluents de distilleries, d'agro-industries, ainsi que des milieux anaérobies comme des sédiments et des boues de sites récepteurs d'effluents, l'obtention des souches pures bactériennes fermentant le glycérol est réalisée selon le protocole suivant.

Une fiole type pénicilline, contenant 120 ml de milieu minéral tamponné et du glycérol ( 20 g/l ), est inoculée par 10 ml de la suspension bactérienne et incubée selon les conditions citées à l'exemple 3. En phase fermentaire du glycérol, contrôlée par analyse en HPLC, 90 ml de la suspension sont prélevés pour inoculer un réacteur anaérobie, contenant 0,9 l de milieu de culture décrit ci-dessus. Durant la phase de production de propanediol observée par analyse HPLC, 1 ml de culture microbienne anaérobie du réacteur est prélevé en condition aseptique et anaérobie ( seringue purgée à l'azote ) pour inoculer un tube à bouchon à vis muni d'un septum, contenant 9 ml d'eau physiologique anaérobie stérile.

A partir du tube, des dilutions successives d'un facteur 10 sont réalisées de tube en tube. Pour chaque tube de dilution de  $10^3$  à  $10^6$ , deux boîtes de Pétri sont préparées: milieu brewer's ( Merck ) en simple couche et milieu brewer's en double couche pour isolement des microorganismes anaérobies stricts. L'incubation se déroule en jarre anaérobie, purgée à l'azote, et maintenu sous anaérobiose par un dispositif " Anaerocult " de la Société Merck à 37°C. Après 48 h, les colonies sont prélevées et inoculées en tube de milieu glycérol (A) pour examen et identification après 24 h de culture selon les

critères et méthodes de microbiologie préconisés pour les microorganismes anaérobies stricts et facultatifs.

Selon cette méthode trois souches :

- *Enterobacter agglomerans*, biogroupe V
- 5        - *Clostridium butyricum*
- *Citrobacter amalonaticus*

sont obtenues à partir des sources microbiennes suivantes : boues de digesteur anaérobie, boues et sédiments de milieux naturels ( sols, lagunes, étangs), à partir desquelles la production de 1,3-propanediol est observée.

Les deux souches : *Enterobacter agglomerans* et *Citrobacter amalonaticus*, appartiennent à des espèces bactériennes , non connues dans la littérature scientifique pour la fermentation du glycérol . La nouvelle souche de *C. butyricum* obtenue est différente des souches connues de l'espèce par les profils fermentaires ( voir exemple 3).

EXEMPLE 2:

20        Production de 1,3-propanediol à partir de glycérol par *Enterobacter agglomerans*.

Le milieu nutritif utilisé pour la croissance et la production de 1,3-propanediol par *Enterobacter agglomerans* est un milieu minéral enrichi en extrait de levure et en sel de cobalt, contenant du glycérol  
25        comme seule source de carbone et d'énergie .

Composition du milieu de culture

	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 3H <sub>2</sub> O	10,7 g
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,4 g
5	MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
	CaCl <sub>2</sub>	0,1 g
	COCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	1,8 mg
	Extrait de levure	1 g
	Solution minérale	1 ml
10	Glycérol	20 g
	H <sub>2</sub> O distillée qsp	1 l

Solution minérale

	EDTA	5 g
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,124 g
15	MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,03 g
	COCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,02 g
	FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	2 g
	ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
	NaMoO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,03 g
20	NiCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,02 g

Solution minérale ( suite)

	CuCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,01 g
	H <sub>2</sub> O distillée qsp	1 l

25 Le milieu est porté à ébullition puis refroidi sous azote . Après autoclavage, il est réduit par ajout d'une solution de L-cystéine à 20 gl<sup>-1</sup> ( 0,5 % vol/vol).

30 La pré-culture ( 90 ml) inoculée à partir de tubes de conservation ( 10 ml) est réalisée en flacons pénicilline anaérobies, à 37°C. Après 36 h d'incubation, l'inoculum activé est transféré dans un réacteur anaérobie de 1 l précédemment décrit, contenant 904,5 ml de milieu réduit à 2 % de glycérol



et purgé à l'azote gazeux.

La fermentation se déroule à 37°C , à pH régulé à 7.

Le glycérol est exclusivement converti par Enterobacter agglomerans en 1,3-propanediol et acétate en tant que métabolites hydrocarbonés avec des rendements molaires respectifs de 74 mM de PPD et de 24 mM d'acétate formés à partir de 100 mM de glycérol consommé . Les résultats sont rassemblés à la figure 1 qui est un diagramme illustrant le profil de conversion du glycérol par Enterobacter agglomerans, dans lequel on a porté, en abscisses, la durée de conversion exprimée en heures et en ordonnées, respectivement sur l'axe de gauche la quantité de biomasse exprimée en g/l et sur l'axe de droite les quantités de glycérol et de produits formés (1,3-propanediol et acétate) , exprimées en mM.

La productivité volumique maximale en 1,3-propanediol est de 1,98 g de PPD/l/h, ce qui se traduit par une durée de fermentation de 12 heures.

#### EXEMPLE 3:

#### Production de 1,3-propanediol par Clostridium butyricum.

Clostridium butyricum est mis en culture pendant 24 heures sur milieu minéral fortement tamponné à base de glycérol dont la composition est décrite ci-dessous. L'incubation se déroule dans des flacons de type pénicilline, hermétiquement clos, de 120 ml , en conditions anaérobies strictes (atmosphère d'azote, ajout de composés réducteurs dans le milieu après autoclavage ) à 37°C . Le taux d'ensemencement est de 10% vol/vol.

Ces précultures sont ensuite utilisées pour

inoculer des fermenteurs de 1 l ( ajout de 90 ml de pré-culture dans 900 ml de milieu nutritif stérile ) , maintenus en conditions anaérobies ( utilisation d'azote en phase gazeuse ) et munis de systèmes de régulation du pH (ajout contrôlé de soude 2N) et de température ( circulation d'eau thermostatée ) .

L'homogénéisation est assurée par agitation magnétique et un piège à oxygène à pyrogallol, placé à l'interface réacteur-atmosphère , permet d'éviter les entrées d'oxygène dans le réacteur .

Les fermentations ont lieu à 37°C , à pH contrôlé à 6,5 sur milieu salin contenant 10 % vol/vol de glycérol.

TABLEAU I  
Composition des milieux de culture

	(A) milieu tamponné (fiOLE)	(B) milieu pour réacteur pH régulé
20	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 3,4 g	1g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,3 g	0,5g
	CaCO <sub>3</sub> 2 g	0
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 g	2g
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 0,2 g	0,2g
25	CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O 20 mg	20mg
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O 5 mg	5mg
	Extrait de levure 1 g	1g
	Glycérol 20 g	20 à 200g
30	H <sub>2</sub> O distillée qsp 1000 ml	QSP 1000 ml

Le milieu tamponné (A) est porté à ébullition, réparti dans des fioles hermétiquement bouchées (bouchon butyl et capsule métallique) et refroidi sous azote avant autoclavage.

Les réacteurs, après autoclavage, sont refroidis sous flux d'azote pour éviter la dissolution d'oxygène dans le milieu. Les solutions réductrices et

vitaminiques ci-après sont ensuite ajoutées ( à 2% et 4% volume/volume respectivement ) dans ces milieux.

Solution réductrice

5 6,25 g de L-cystéine et 6,25 g de  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $9\text{H}_2\text{O}$  sont dissous dans 500 ml d'une solution de soude 0,8 N préalablement désoxygénée.

Solution vitaminique

	Biotine	5 mg
	Acide para-amino-benzoïque	2 g
10	Cobalamide	15 mg
	$\text{H}_2\text{O}$ distillée qsp	100 ml

Le profil de fermentation est présenté à la figure 2 qui est un diagramme analogue à la figure 1 , établi pour illustrer le profil de conversion du glycérol par Clostridium butyricum, les produits formés étant dans ce cas le 1,3-propanediol et le butyrate. Le rendement de la culture pure de Clostridium butyricum ( souche I-1211) est de 57 mM de 1,3-propanediol formé par 100 mM glycérol consommé. Le butyrate est le seul co-produit hydrocarboné détecté en phase aqueuse et représente moins de 7% de la quantité molaire de glycérol consommé .

20 Lorsque la fermentation débute avec 65 g glycérol/l, la productivité maximale de conversion en 1,3-propanediol est de 4,5 g/l/hr et la durée de fermentation est de 22 heures.

EXEMPLE 4:

Production de 1,3-propanediol par Clostridium butyricum à partir de résidus industriels d'origine agricole et alimentaire contenant du glycérol.

30 Le microorganisme est pré-cultivé en conditions d'anaérobiose stricte, à 37°C en fioles pénicilline, sur milieu minéral fortement tamponné (A) décrit dans

l'exemple 3, pendant 24 heures . Ces précultures sont ensuite utilisées pour inoculer un milieu d'origine industrielle dans lequel le glycérol est le composé organique majeur, représenté par des effluents de distillation d'alcool d'origine agricole.

Pour les fermentations présentées ci-après, les co-produits disponibles industriellement sont préparés selon le protocole suivant : ajustement de la teneur en glycérol entre 14 et 15,8 g/l par dilution du milieu et addition de facteurs nutritifs et salins ( $K_2HPO_4$ : 1  $g\ l^{-1}$ ;  $K_2HPO_4$ : 0,5  $g\ l^{-1}$ ;  $(NH_4)_2SO_4$ : 2  $g\ l^{-1}$ ;  $MgSO_4, 7H_2O$ : 0,2  $g\ l^{-1}$ ;  $COCl_2, 2H_2O$ : 20  $mg\ l^{-1}$ ;  $FeSO_4, 7H_2O$ : 5  $mg\ l^{-1}$ ; 1  $g\ l^{-1}$  d'extrait de levure ).

Les réacteurs anaérobies contenant 0,9 l de milieu sont autoclavés et refroidis sous azote et réduits par addition de la solution réductrice citée à l'exemple 1.

L'inoculation est effectuée par 90 ml de suspension bactérienne , et la fermentation est conduite à pH 6,5 avec régulation et à 37°C.

TABLEAU II

Caractéristiques de la conversion de glycérol  
d'origine naturelle par *Clostridium butyricum* ( souche  
I-1211)

5	Origine du substrat	Eau résiduaire de distillerie n°1 (vinasse de vin rouge)	Eau résiduaire de distillerie n°2 (vinasse de vin blanc)
10	concentration initiale en glycérol	15,8 g/l	14g/l
	production de 1,3-propanediol	8,4 g/l	6,6 g/l
15	rendement molaire mole de PPD produit/mole de glycérol consommé	0,64	0,57

EXEMPLE 5:

Production de 1,3-propanediol par une population microbienne de digesteur anaérobie d'eaux résiduaire de distilleries de bio-éthanol, contenant les souches *Clostridium butyricum* ( souche I-1211) ou *Enterobacter agglomerans*( souche I-1210).

La flore microbienne mixte anaérobie a été mise en culture selon le protocole de préparation des fermentations décrit dans l'exemple 3.

Le milieu de fermentation en réacteur anaérobie comprend du glycérol à concentration variable : entre 20 et 125 % ( poids/volume); les cultures se déroulent à pH compris entre 5 et 8, et à 37°C.

Les figures 3a et 3b montrent le profil de conversion du glycérol par la flore anaérobie de digesteur qui est une flore microbienne anaérobie

mixte.

La figure 3a est un diagramme analogue aux figures 1 et 2 avec en ordonnées, à droite, les quantités en mM de glycérol et de 1,3-propanediol formés, tandis qu'à la figure 3b l'axe des ordonnées à gauche montre les quantités en mM de gaz ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) formées et à droite, les quantités en mM de produits (1,3-propanediol et butyrate) formés. Le 1,3-propanediol est le principal produit formé par fermentation du glycérol par la population microbienne anaérobie, avec un taux de conversion très élevé : 66,7 mM de 1,3-propanediol formé à partir de 100 mM de glycérol consommé. La vitesse maximale de production de 1,3-propanediol (productivité volumique) est de 2,3 g/l/hr, et pour une durée de fermentation de 11 heures. Le propanediol formé n'est pas consommé et s'accumule au cours de la fermentation. L'acétate et le butyrate sont formés dans des proportions molaires équivalentes pendant la phase de production de 1,3-propanediol, représentant respectivement 7,4 et 6,6 % (mM) du glycérol consommé. Le  $\text{CO}_2$  et l'hydrogène sont les produits gazeux formés.

Les effets des conditions de pH et de la teneur en glycérol ont été illustrés aux figures 4 et 5, respectivement.

La figure 4 montre l'effet du pH sur le rendement molaire de production de 1,3-propanediol par la flore microbienne anaérobie mixte définie à l'exemple 5.

Il s'agit d'un diagramme dans lequel on a porté le pH en abscisses et, en ordonnées, le rendement molaire en 1,3-propanediol, exprimé en %.

La figure 5 montre l'effet de la concentration

en glycérol sur la vitesse maximale de production de 1,3-propanediol pour la même flore microbienne anaérobie mixte . Il s'agit d'un diagramme dans lequel on a porté en abscisses la quantité de glycérol exprimée en g/l et en ordonnées la productivité, exprimée en g/l/h, de 1,3-propanediol formé.

D'un point de vue rendement de conversion du glycérol en 1,3-propanediol, le pH le plus favorable est compris entre 6,5 et 7; rendement de 66,7 % ( mM propanediol formé pour 100 mM de glycérol consommé ) . Mais la production de propanediol s'effectue à pH 7,5 et jusqu'à pH 5, où le rendement est encore supérieur à 50%. Au niveau cinétique, la plus forte productivité est obtenue à pH 6,5 et pour une concentration initiale en glycérol de 50 g/l : 2,4 g 1,3-propanediol formé par litre et par heure.

REVENDICATIONS

1. Procédé pour l'obtention de produits à  
activité bactérienne , capables de transformer le  
glycérol en 1,3-propanediol , ledit procédé comprenant  
5 les étapes de :

a) préculture de populations anaérobies ,  
issues d'habitats microbiens anaérobies , ladite  
préculture étant réalisée dans des conditions  
anaérobies sur milieu nutritif tamponné contenant du  
10 glycérol comme seule source de carbone,

b) isolement des précultures microbiennes  
actives capables de fermenter le glycérol;

c) enrichissement par fermentation discontinue  
desdites précultures dans un réacteur anaérobie , sur  
15 milieu nutritif à base de glycérol comme substrat et à  
pH régulé ;

d) isolement des produits à activité  
bactérienne capables de transformer le glycérol en  
1,3-propanediol.

20 2. Procédé selon la revendication 1,  
caractérisé en ce qu'à titre d'habitats microbiens  
anaérobies , on utilise des digesteurs anaérobies ,  
par exemple d'effluents de distillerie, d'agro-  
industrie ou bien des milieux anaérobies tels que des  
25 sédiments et des boues de sites récepteurs  
d'effluents.

3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou  
2, caractérisé en ce qu'on règle le pH à une valeur  
comprise entre 5 et 8, et de préférence entre 6 et  
30 7,5.

4. Procédé selon l'une quelconque des  
revendications 1 à 3, caractérisé en ce que  
l'isolement des souches bactériennes est opéré à



partir de prélèvements en anaérobiose, avec dilution des populations puis étalement sur boîtes de Pétri sur milieux de cultures gélosés, dans des conditions anaérobies.

5           5. Produits à activité bactérienne, capables de transformer le glycérol en 1,3-propanediol, susceptibles d'être obtenus par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4.

10           6. Produits selon la revendication 5, comprenant des bactéries Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum ou Citrobacter amalonaticus, sous forme de cultures mixtes d'écosystèmes anaérobies.

15           7. Produits selon l'une des revendications 5 ou 6 consistant en des bactéries appartenant à l'espèce Enterobacter agglomerans.

            8. Souche Enterobacter agglomerans, inscrite à la CNCM sous le n° I-1210.

20           9. Souche de Clostridium butyricum inscrite à la CNCM sous le n° I-1211.

            10. Souche de Citrobacter amalonaticus, inscrite à la CNCM sous le n° I-1212.

25           11. Application des produits, espèces et souches à activité bactérienne selon l'une quelconque des revendications 5 à 9, en vue de la conversion du glycérol par fermentation en 1,3-propanediol.

30           12. Application selon la revendication 11, selon laquelle on utilise l'espèce Enterobacter agglomerans, en particulier la souche Enterobacter agglomerans I-1210, la conversion du glycérol en 1,3-propanediol étant réalisée en condition d'anaérobiose avec contrôle et régulation du pH entre 6 et 7,5 et de préférence à pH 7, dans une gamme de température

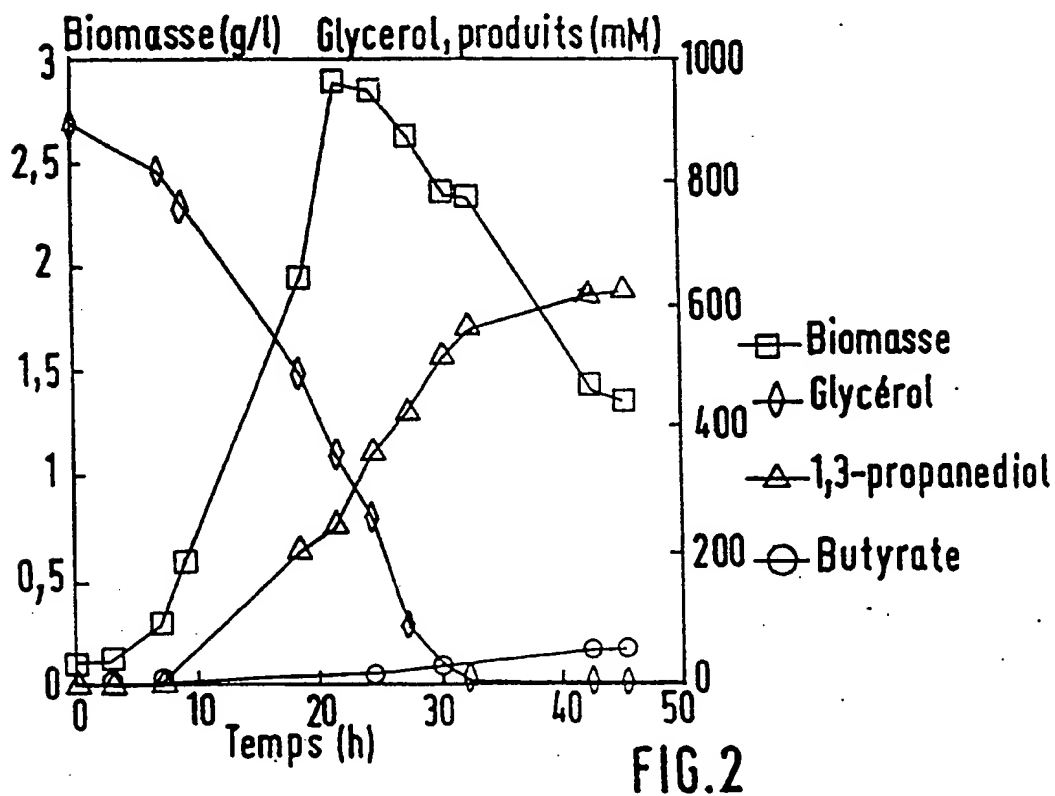
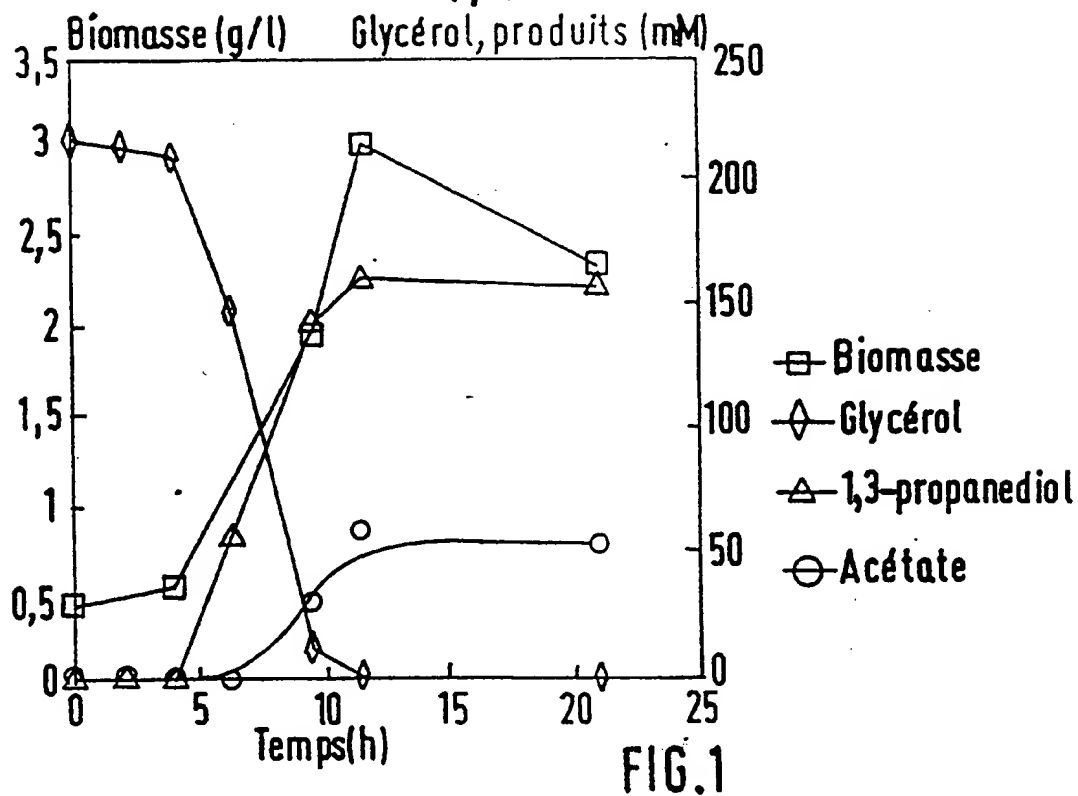
située entre 28 et 40°C environ .

13. Application selon la revendication 11, dans laquelle on utilise la souche Clostridium butyricum I-1211 , la conversion du glycérol en 1,3-propanediol étant réalisée en anaérobiose , avec pH régulé entre 5 et 8, et de préférence entre 6 et 7,5 , et à une température située entre 32 et 40°C.

14. Application selon la revendication 11 , dans laquelle on utilise une flore microbienne anaérobie mixte , en particulier une population microbienne contenant les espèces Enterobacter agglomerans et Clostridium butyricum et/ou les souches Clostridium butyricum I-1211 et Enterobacter agglomerans I-1210.

15. Application de produits à activité bactérienne selon la revendication 5, consistant en des populations bactériennes mixtes fermentant le glycérol et produisant du 1,3-propanediol, lesdites populations contenant notamment la souche Citrobacter amalonaticus I-1212 selon la revendication 10.

1/3



2/3

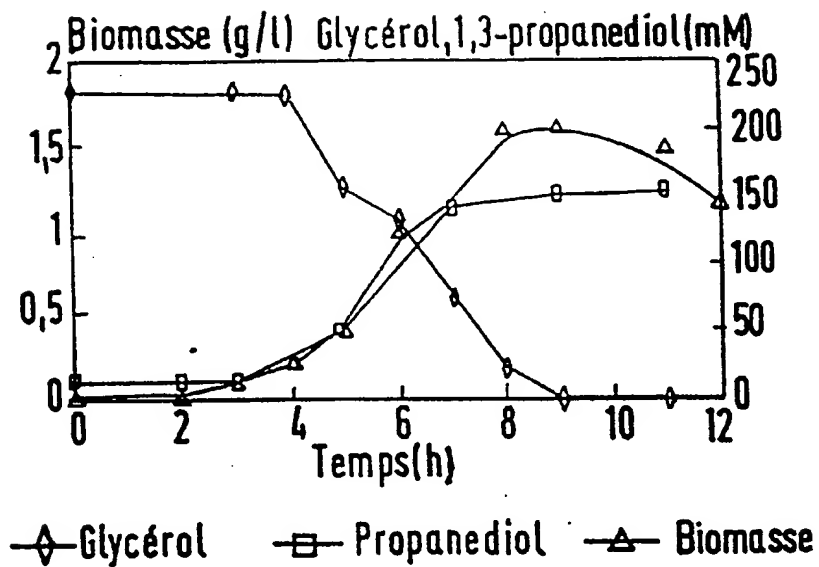


FIG.3a

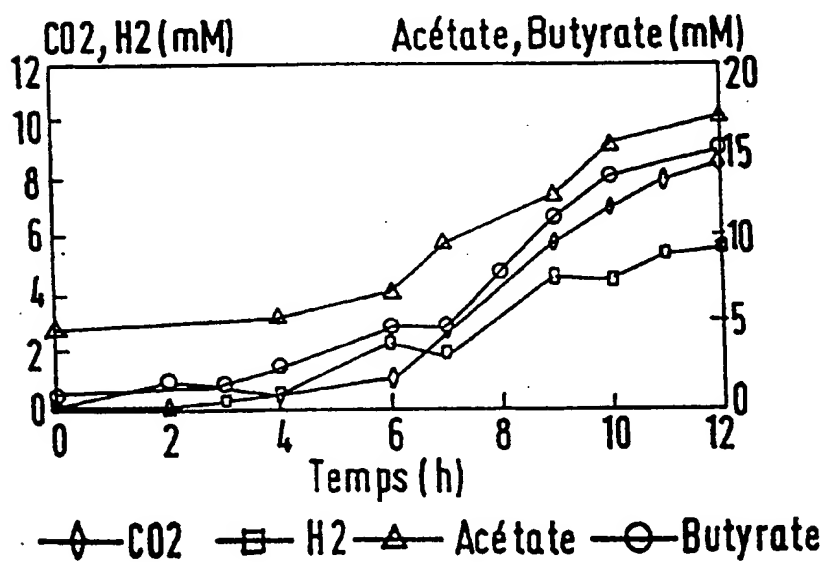


FIG.3b

FEUILLE DE REMPLACEMENT

3/3

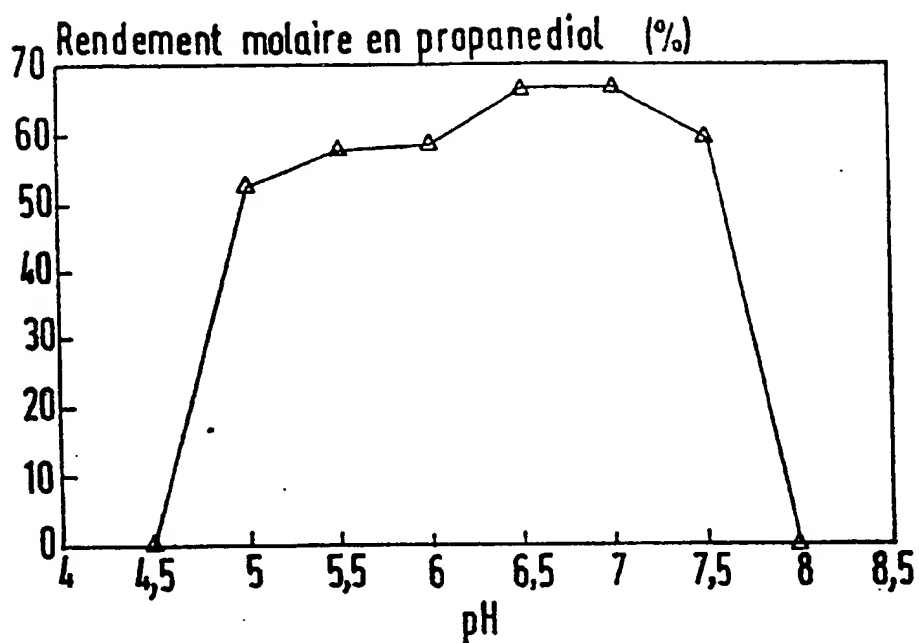


FIG.4

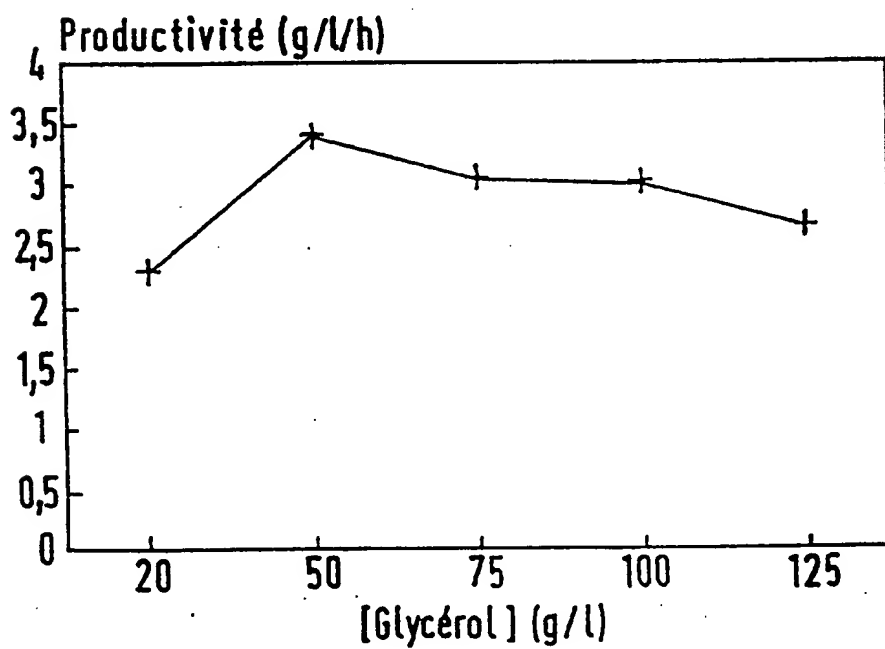


FIG.5

FEUILLE DE REMPLACEMENT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00568

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC <sup>5</sup> : C12P 7/18;      //(C12P 7/18, C12R 1:01, C12R 1:145) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC <sup>5</sup> : C12P; C12R		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Vol. 36, No. 5, February 1992, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 592 - 597 H. BIEBL ET AL. "Glycerol conversion to 1, 3-propanediol by newly isolated clostridia." see abstract see page 593, column 1, paragraph 4 see page 596, column 1, last paragraph - page 597, column 1, last paragraph ---	1-3
A	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Vol. 36, No. 3, December 1991, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 289 - 294 B. GUNZEL ET AL. "Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum up to a scale of 2m3." see the whole document ---	1,9
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 20 August 1993 (20.08.93)		Date of mailing of the international search report 14 September 1993 (14.09.93)
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00568

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP, A, 0361082 (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN) 4 April 1990 (cited in the application)  -----	

FR 9300568  
SA 75451

20/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0361082	04-04-90	DE-A- 3829618	15-03-90
		DE-A- 3924423	31-01-91
		JP-A- 3065192	20-03-91
-----			

4003 18801 042

**For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82**



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT/FR 93/00568

Demande Internationale No

<b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB CIB 5 C12P7/18;                      //(C12P7/18, C12R1:01, C12R1:145)		
<b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>		
Documentation minimale consultée <sup>8</sup>		
Système de classification	Symboles de classification	
CIB 5	C12P ;            C12R	
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté <sup>9</sup>		
<b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>		
Catégorie <sup>10</sup>	Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>11</sup> des passages pertinents <sup>12</sup>	No. des revendications visées <sup>14</sup>
X	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 36, no. 5, Février 1992, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 592 - 597 H. BIEBL ET AL. 'Glycerol conversion to 1,3-propanediol by newly isolated clostridia.' voir abrégé voir page 593, colonne 1, alinéa 4 voir page 596, colonne 1, dernier alinéa - page 597, colonne 1, dernier alinéa <div style="text-align: center;">---</div> <div style="text-align: right;">-/--</div>	1-3
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <sup>10</sup> Catégories spéciales de documents cités: <sup>11</sup>            "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent            "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date            "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)            "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens            "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée         </div> <div style="width: 45%;">           "T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention            "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive            "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.            "A" document qui fait partie de la même famille de brevets         </div> </div>		
<b>IV. CERTIFICATION</b>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
20 AOUT 1993	14 -09- 1993	
Administration chargée de la recherche internationale	Signature du fonctionnaire autorisé	
OFFICE EUROPEEN DES BREVETS	BEVAN S.R.	

III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup>		(SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDQUES SUR LA DEUXIEME FEUILLE)
Catégorie *	Identification des documents cités, <sup>15</sup> avec indication, si nécessaire des passages pertinents <sup>17</sup>	No. des revendications visées <sup>18</sup>
A	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. vol. 36, no. 3, Décembre 1991, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 289 - 294 B.GUNZEL ET AL. 'Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum up to a scale of 2m3.' voir le document en entier -----	1,9
A	EP,A,0 361 082 (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN) 4 Avril 1990 cité dans la demande -----	

FR 9300568  
SA 75451

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

**UPO FORM P0672**

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP-A-0361082	04-04-90	DE-A- 3829618	15-03-90
		DE-A- 3924423	31-01-91
		JP-A- 3065192	20-03-91
-----			

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Office

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED PURSUANT TO  
THE PATENT COOPERATION TREATY

(51) Int. Patent Class.5: C12P 7/18/(C12P7/18 C12R 1:01, 1:145)	A1	(11) Int. Publication No.: WO 93/25696 (43) Int. Publication Date: Dec.23, 1993
(21) Int. Application No.: PCT/FR93/00568 (22) Int. Filing Date: June 14, 1993 (30) Priority Data: 92/07212 June 15, 1992 FR (71) Applicant (for all designated countries except US): NATIONAL INSTITUTE FOR AGRONOMIC RESEARCH [FR/FR] 147, rue de l'Université F-75341 Paris Cédex 07 (FR) (72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (US only) BORIES, André [FR/FR] 5, rue de Rec F-11110 Armissan (FR)  CLARET, Carole [FR/FR] 4, chemin de la Gloriette F-11110 Vinassan (FR)	(74) Agent: MICHELET, Alain Cabinet Harlé & Phélip 21, rue de La-Rochefoucauld F-75009 Paris (FR) (81) Designated Countries: CA US European Patent (AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE)  Published With international search report.	

(54) Title: PROCESS FOR MAKING PRODUCTS HAVING BACTERIAL  
ACTIVITY CAPABLE OF CONVERTING GLYCEROL INTO 1,3-PROPANEDIOL, THE  
CORRESPONDING STRAINS, AND THEIR USE IN THE INDUSTRIAL PRODUCTION  
OF 1,3-PROPANEDIOL.

(57) Abstract: Process for making products having bacterial  
activity capable of converting glycerol into 1,3-propanediol.  
The invention comprises first obtaining bacterial species or  
strains that ferment glycerol from anaerobic microbial habitats  
present in nature. These active precultures are enriched by  
batch fermentation. The products having bacterial activity are  
isolated to convert glycerol by fermentation into 1,3-  
propanediol. The conversion yield is high, and the biosynthesis  
of 1,3-propanediol avoids the formation of a large number of by-  
products.

# For information only

Codes used to identify PCT party states on the cover pages of PCT patent applications.

AT	Australie	FR	France	MR	Mauritanie
AU	Australie	GA	Gabon	MW	Malawi
BA	Banarade	GB	Royaume-Uni	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	GN	Guinée	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	PL	Pologne
BH	Bahrein	IE	Irlande	PT	Portugal
BR	Bresil	IT	Italie	RO	Roumanie
CA	Canada	JP	Japon	RU	Fédération de Russie
CF	République (Centrafrique)	KP	République populaire démocratique	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SK	République slovaque
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SN	Sénégal
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SU	Union soviétique
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TC	Togo
DE	Allemagne	MC	Madagascar	UA	Ukraine
DK	Danemark	MI	Malie	US	Etats-Unis d'Amérique
ES	Espagne	MN	Mongolie	VN	Viet Nam
FI	Finlande				

Process for Making Products Having Bacterial Activity  
Capable of Converting Glycerol into 1,3-Propanediol,  
the Corresponding Strains, and their Use in the Industrial  
Production of 1,3-Propanediol.

This invention involves making 1,3-propanediol by fermenting glycerol. More specifically, the subject is making products having bacterial activity capable of converting glycerol into 1,3-propanediol and their use in the industrial production of 1,3-propanediol. The bacterially active products obtained by the invention are microbial populations occurring in anaerobic ecosystems of digesters of agroindustrial residues, sediments, and sludges or pure new strains produced from these media. Among the latter, Enterobacter agglomerans, Biogroup V, and Clostridium butyricum are examples.

Another subject of the invention is the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol in coproducts and residues from converting materials of vegetable or animal origin, and especially, coproducts from the distillation of alcohol of agricultural origin (industrial ethanol or bioethanol, liqueurs, brandies, and analogous substances).

1,3-Propanediol or trimethylene glycol is a basic product for synthesizing polyurethanes and polyesters. It can be substituted advantageously for raw materials currently used, such as ethylene glycol, 1,2-propanediol, and 1,4-butanediol, due to the characteristics that it imparts to the resulting products, such as fiber tenacity, elasticity, and resistance to light and corrosion. It is also used as an additive in preparing agricultural food products and pharmaceutical products (for example, as a humectant), in animal feeds, tobacco, pharmaceutical preparations and others.

1,3-Propanediol is synthesized chemically from acrolein, a very toxic material, from fossil sources. The synthesis requires several steps: dehydration to hydroxypropanal followed by catalytic hydrogenation. These involve difficult reactions with risks due to the acrolein and secondary products, strict synthesis conditions, and possible contamination of the

final product with toxic substances, all of which restrict the use of 1,3-propanediol.

The formation of 1,3-propanediol from glycerol as the carbonaceous substrate has been reported in recent years for several optionally and strictly anaerobic bacteria. However, the number of bacteria producing 1,3-propanediol and knowledge of the production conditions are still limited. Only three principal species are known: *Clostridium*, *Klebsiella*, and *Citrobacter*, a narrow choice that limits possibilities for improving production.

The first research on the microbial formation of 1,3-

propanediol was reported by Magazanik and colleagues in 1954 (J. Bacteriol., 66, 611-619) with *Klebsiella pneumoniae*, an

optionally anaerobic bacterium. The metabolic route for the biosynthesis of 1,3-propanediol was later characterized by Forage and Foster in 1982 (J. Bacteriol., 149, 413-419). It includes two enzymatic steps accomplished by a glycerol dehydrase with a dependant B12 coenzyme and a 1,3-propanediol oxidoreductase with NAD. The yield for the conversion of glycerol as a monosubstrate into 1,3-propanediol is about 40-45% (weight/weight) with this bacterium. The other products formed by the bacterium from glycerol are the acetate, the lactate, ethanol, and 2,3-butanediol.

One species in the *Citrobacter* genus has been described as forming 1,3-propanediol, *Citrobacter freundii* (Hommann and colleagues, 1990, Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 121-126). The conversion yield with glycerol as a monosubstrate is close to 50% (weight/weight), with the predominant formation of the acetate as the main fermentation coproduct, with secondary products, such as ethanol and the lactate. As far as the applicant knows, the only strictly anaerobic microorganisms cited in the literature as fermenting glycerol into 1,3-propanediol belong to the *Clostridium* species and the types are *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. butylicum*, *C. butyricum*, and *C. kantonoi*.

Another reference illustrating the state of the art in the field of the invention is Patent Application EP-A-0 361.082. It describes a process of selecting available bacterial strains,



in particular in collections of cultures, for their capability to convert glycerol into 1,3-propanediol. According to this process, fermentation is conducted under the usual conditions in the presence of one of the selected strains with a 5% solution of glycerin as the sole source of carbon. Strains are selected for the best yield in conversion to 1,3-propanediol.

A process of selecting strains is also known, starting with samples of decomposing straw and of compost. However, this process, described by Biebl et al (1991, Appl. Microb. Biol., 36, no. 5, 592-597) has the significant disadvantage of requiring pasteurization of the samples before culturing. Only sporulated microorganisms survive this operation, while many species, such as *Citrobacter* and *Klebsiella*, are destroyed.

Thus, this process eliminates, before the selection step, microorganisms that could have interesting characteristics. Therefore, it is very specific and permits selection only from a limited range of microorganisms.

It is further noted that this reference mentions only isolating the strains from habitats, such as decomposing straw or compost, where the organisms are in the presence of air, and not from anaerobic habitats.

When starting with glycerol as the only carbonaceous substrate, the fermentation route with *Clostridium* leads to, respectively:

- the synthesis of 1,3-propanediol, a route assuring the regeneration of reduced coenzymes (NADH),
- the formation of metabolites, butyrate, acetate, ethanol, butanol, carbon dioxide, and hydrogen, in variable proportions depending on types and conditions, but which result directly or indirectly from the standard routes of energy production (ATP), which also generate the reduced coenzyme. Attempts to supply carbonaceous substrates, such as the oses, to promote the energy production routes and to preferentially orient the synthesis of 1,3-propanediol from glycerol lead to the accumulation of these secondary products, which are potential

The conditions for using these bacterial strains, in anaerobically pure cultures, are handicaps for the industrial scale production of 1,3-propanediol. It is actually indispensable to work under sterile conditions to avoid contamination, to acclimatize the strains to the production media, and to coordinate the compositions and parameters of the media. Otherwise, the reaction products are sensitive to inhibitors of the fermentation medium, initially present or subsequently formed.

The invention involves obtaining optionally and strictly anaerobic bacteria that ferment glycerol and the production of 1,3-propanediol by newly described and obtained species and strains in pure or mixed cultures. This process is intended for the production of 1,3-propanediol mainly from glycerol contained in substances resulting from industrial processes of converting materials of vegetable origin or from media based on purified glycerol.

Until now, as far as the applicant knows, no process for making 1,3-propanediol refers to methods of obtaining, isolating, and using microbial strains from anaerobic bacterial habitats. Because of the limited number of strains producing 1,3-propanediol, there are difficulties in acclimatizing the strains to media as varied as those of industrial origin.

A primary object of the present invention is a process for obtaining products with bacterial activity, capable of converting glycerol into 1,3-propanediol, the said process comprising the steps of (a) preculture of anaerobic populations from anaerobic microbial habitats, the said preculture being conducted in anaerobic conditions on a buffered nutrient medium containing glycerol as the sole source of carbon, (b) isolating active microbial precultures capable of fermenting glycerol, (c) enriching the said precultures in an anaerobic reactor in batch fermentation on a nutrient medium based on glycerol as a substrate at a regulated pH, and (d) isolating products having

bacterial activity capable of converting glycerol into 1,3-propanediol.

The invention starts from the observation that fermentation of glycerol into 1,3-propanediol is a principal preliminary step in the degradation that occurs in anaerobic ecosystems.

This invention comprises obtaining bacterially active products, especially bacterially pure strains, that ferment glycerol from anaerobic microbial habitats, represented, for example, by anaerobic digesters, sediments from natural environments (soils and others), and sludges from effluent holding basins.

In the invention, precultures of anaerobic populations from anaerobic microbial habitats are made under anaerobic conditions on a buffered nutrient medium, based on glycerol as the sole source of carbon and energy, with the objective of promoting the development of strains capable of fermenting glycerol. The active precultures are enriched by batch fermentation in an anaerobic reactor on a nutrient medium based on glycerol as the substrate at a regulated pH.

The operating pH conditions depend on the type of isolated microorganisms. The pH's between 5 and 8, preferably between 6 and 7.5, have proved to be the most appropriate.

During the phase of glycerol consumption by the culture enriched in microorganisms that ferment glycerol, bacterial strains are isolated by anaerobic sampling, diluting the populations, and then spreading the populations in Petri dishes by a single or double layer technique in a agar culture medium adapted to optionally or strictly anaerobic microorganisms.

The invention involves the products and bacteria thus obtained from anaerobic microbial sources capable of producing 1,3-propanediol and belonging, in particular, to the Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum, and Citrobacter amalonaticus species.

The invention also involves new bacterial strains identified by their registration number with the National collection of Microorganism cultures of the Pasteur Institute (CNCM), 25, rue de Docteur Roux, PARIS, namely:

- the Enterobacter agglomerans strain, Biogroup V (PPDAS-INRA strain), registered as No. I-1210, May 20, 1992,
- the Clostridium butyricum strain (PPDAS-INRA strain), registered as No. I-1211, May 20, 1992, and
- the Citrobacter amalonaticus strain (GAF-INRA strain), registered as No. I-1212, May 20, 1992.

As still another aspect of the invention, the process of making 1,3-propanediol includes using the bacterially active products either as pure cultures, in particular, Enterobacter agglomerans and Clostridium butyricum bacteria, or as mixed cultures of anaerobic ecosystems that contain at least one of the species or strains of Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum, or Citrobacter amalonaticus.

The invention's process can use the Enterobacter agglomerans bacterial species and more particularly, the new Enterobacter agglomerans strain to make 1,3-propanediol from glycerol as the sole source of assimilated carbon, a species newly described for its capacity to ferment glycerol into 1,3-propanediol. The Enterobacter agglomerans strains are used under anaerobic conditions on a culture medium containing cobalt, especially on a mineral medium to which has been added 45 mg/l of cobalt, with control and regulation of the pH between 6 and 7.5, preferably at pH 7, in a temperature range located about between 28 and 40° C.

The new Enterobacter agglomerans strain is characterized by a 1,3-propanediol production yield of at least 74 millimoles per 100 millimoles of glycerol consumed and a volume productivity of at least 2 g of propanediol per liter per hour in the active fermentation phase (glycerol at 2%). Analysis of the fermenting profile shows that the biosynthesis of 1,3-propanediol is accompanied by the exclusive formation of acetic

acid as the major cometabolite determined in the aqueous phase, which constitutes a means to simplify the purification phase. The strain also shows a slightly elevated gas-producing characteristic starting from glycerol.

The characteristics related to the fermentation conditions and performances of glycerol into 1,3-propanediol as described above are very high yield, high productivity, and acetate as the only accumulated coproduct. These give the invention's process using the Enterobacter agglomerans species, and especially, the new Enterobacter agglomerans strain, better possibilities for making propanediol from glycerol as the source of assimilable carbon, from the standpoint of industrial application to purified glycerol solutions or glycerol contained in process waters from the conversion of renewable organic materials.

The invention's process can also use the new Clostridium butyricum strain for making propanediol from glycerol in byproducts of agroindustrial origin or from purified glycerol under the following fermentation conditions:

- strict anaerobiosis, the medium being purged by nitrogen flow and the addition of reducer compounds,
- pH regulated to values between 5 and 8, preferably between 6 and 7.5, and
- temperature in the range between 32 and 40° C, more particularly, close to 37° C.

The fermentation medium contains cofactor mineral elements of yeast extract and glycerol at concentrations between 15 and 200 g/l.

It can also contain other organic substances, either nonassimilated or capable of being used as cosubstrate.

The yields for conversion of glycerol to propanediol obtained on a medium of industrial origin are similar to those

measured on a synthetic medium, namely 64% and 57% respectively (molar yield).

The production of propanediol from glycerol as the sole carbonaceous substrate by Clostridium butyricum is conducted under the invention's conditions with an initial glycerol concentration up to 200 g/l, preferably between 65 and 180 g/l, with a volume productivity between 4.5 and 2.3 g of propanediol per liter of fermenting agent and per hour, during the active fermentation phase.

Although the strains of the Clostridium species that ferment glycerol into 1,3-propanediol, as reported in the literature, produce many byproducts, such as acetate, butyrate, ethanol, and lactate, the invention's process produces a single major comatabolite, butyric acid, which can facilitate subsequent operations to recover 1,3-propanediol.

The invention's process can use any anaerobic microbial population of natural or industrial origin in which the presence of the Enterobacter agglomerans or Clostridium butyricum species is demonstrated.

This process for making propanediol from mixed populations thus defined simplifies the fermentation operation by reducing the risk of contamination.

The production of 1,3-propanediol is conducted at a pH between 5 and 8, preferably between 6.5 and 7, for a glycerol concentration between 20 and 125 g/l. At 37° C and pH 6.5, the optimum yield from converting glycerol to propanediol is 66.7%, when the fermentation is conducted with 2% of glycerol. The highest productivity obtained for a culture of 50 g/l of glycerol is 2.4 g/l/hour.

The invention is illustrated without being limited by the following examples.

## EXAMPLE 1

### Obtaining and isolating bacterial strains from anaerobic microbial floras that ferment glycerol into 1,3-propanediol

Obtaining bacterially pure strains that ferment glycerol is accomplished by the following protocol with a microbial flora taken from anaerobic habitats such as the anaerobic digesters of effluents from distilleries and agroindustries, as well as anaerobic media such as sediments and sludges from effluent collection sites.

A penicillin type flask containing 120 ml of a buffered mineral medium and glycerol (20 g/l) is inoculated with 10 ml of the bacterial suspension and incubated according to the conditions described in Example 3. In the glycerol fermenting phase, which is monitored by HPLC analysis, 90 ml of the suspension are withdrawn to inoculate an anaerobic reactor containing 0.9 l of the culture medium described above. During the propanediol production phase, which is followed by HPLC analysis, 1 ml of anaerobic microbial culture is withdrawn from the reactor under aseptic and anaerobic conditions (a syringe purged with nitrogen) to inoculate a tube furnished with a threaded stopper and a septum, containing 9 ml of physiologically sterile anaerobic water.

Starting with this tube, successive dilutions by a factor of ten are done from tube to tube. For each tube of  $10^3$  to  $10^6$  dilution, two petri dishes are prepared containing a single layer brewer's medium (Merck) and a double layer brewer's medium to isolate strictly anaerobic microorganisms. Incubation evolves in an anaerobic jar that is purged with nitrogen and maintained under anaerobiosis at 37° C by an "Anaerocult" device from Merck Company. After 48 hours, the colonies are sampled and inoculated in a tube of glycerol medium (A) for examination and identification after 24 hours of culture according to the microbiological criteria and methods recommended for strictly and optionally anaerobic microorganisms.

Three strains, Enterobacter agglomerans, Biogroup V, Clostridium butyricum, and Citrobacter amalonaticus are obtained

by this method from the following microbial sources: sludges from an anaerobic digester and sediments from natural media (soils, lagoons, and ponds), which have been observed to make 1,3-propanediol.

The two strains, *Enterobacter agglomerans* and *Citrobacter amalonaticus*, belong to bacterial species not known in the scientific literature for glycerol fermentation. The new strain of *C. butylicum* obtained is different from known strains of the species, as seen in the fermentation profiles (see Example 3).

## EXAMPLE 2

### Production of 1,3-propanediol from glycerol by *Enterobacter agglomerans*

The nutrient medium used for growing and making 1,3-propanediol by *Enterobacter agglomerans* is a mineral medium enriched with a yeast extract and a cobalt salt, containing glycerol as the sole source of carbon and energy.

#### Composition of the culture medium

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	10.7 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2 g
CaCl <sub>2</sub>	0.1 g
COCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1.8 mg
Yeast extract	1 g
Mineral solution	1 ml
Glycerol	20 g
H <sub>2</sub> O, distilled, to make	1 liter



### Mineral solution

EDTA	5 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.124 g
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.03 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.02 g
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1 g
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.03 g
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.02 g
Mineral solution (continued)	
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.01 g
H <sub>2</sub> O, distilled, to make	1 liter

The medium is brought to boil and then cooled under nitrogen. After autoclaving, it is reduced by the addition of an L-cysteine solution at 20 g/l (0.5% vol/vol).

The preculture (90 ml) inoculated from storage tubes (10 ml) is conducted in anaerobic penicillin flasks at 37° C. After 36 hours of incubation, the activated inoculum is transferred into a 1-liter anaerobic reactor, as described above, containing 904.5 ml of reduced medium with 2% of glycerol and purged with gaseous nitrogen.

The fermentation evolves at 37° C at a regulated pH 7.

The Enterobacter agglomerans converts the glycerol exclusively into 1,3-propanediol and acetate as hydrocarbon metabolites with molar yields of 74 millimoles of propanediol and 24 millimoles of acetate formed from 100 millimoles of glycerol consumed. The results are shown in Figure 1, which is a diagram illustrating the profile of glycerol conversion by Enterobacter agglomerans. The abscissa shows the duration of conversion expressed in hours. The ordinates show respectively the biomass quantity expressed in g/l on the left axis and the quantities of glycerol and products formed (1,3-propanediol and acetate) expressed in millimoles on the right axis.

The maximum volume productivity in 1,3-propanediol is 1.98 g of PPD/l/h for 12 hours of fermentation.

### EXAMPLE 3

#### Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* is cultured for 24 hours on a strongly buffered mineral medium based on glycerol and with the composition described below. The incubation is conducted in 120-ml penicillin-type flasks, hermetically sealed, under strictly anaerobic conditions (nitrogen atmosphere, addition of reducer compounds into the medium after autoclaving) at 37° C. The degree of inoculation is 10% vol/vol.

These precultures are used to inoculate the 1-liter fermenters (addition of 90 ml of preculture into 900 ml of sterile nutrient medium), maintained under anaerobic conditions (using gaseous nitrogen) and furnished with systems for regulating pH (controlled addition of 2N soda) and temperature (circulation of thermostatted water).

Homogenization is ensured by magnetic stirring. A pyrogallol oxygen trap placed at the reactor interface with the atmosphere prevents oxygen entry into the reactor.

The fermentations take place at 37° C at a pH regulated to 6.5 on a saline medium containing 10% vol/vol of glycerol.

The buffered medium (A) is brought to boiling, divided into hermetically stoppered flasks (butyl stopper and metal cap) and cooled under nitrogen before autoclaving.

After autoclaving, the reactors are cooled under a nitrogen flow to prevent oxygen from dissolving in the medium. The reducer solutions and vitamin solutions described below are added (at 2% and 4% volume/volume respectively) into these media.

TABLE I

## Composition of Culture Media

	(A) Buffered Medium (flask)	(B) Reactor Medium Regulated pH
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3.4 g	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.3 g	0.5 g
CaCO <sub>3</sub>	2 g	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g	2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g	0.2 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	20 mg	20 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	5 mg	5 mg
Yeast extract	1 g	1 g
Glycerol	20 g	20 to 200 g
Water, distilled	to make 1000 ml	to make 1000 ml

Reducer solution

6.25 g of L-cysteine and 6.25 g of Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O are dissolved in 500 ml of a 0.8 N soda solution, previously deoxygenated.

Vitamin solution

Biotin	5 mg
p-Aminobenzoic acid	2 g
Cobalamide	15 mg
Water, distilled, to make	100 ml

The fermentation profile is shown in Figure 2, which is analogous to Figure 1, to illustrate the profile for the conversion of glycerol by Clostridium butyricum, the products formed being in this case 1,3-propanediol and the butyrate. The yield from the pure Clostridium butyricum culture (Strain I-1211) is 57 millimoles of 1,3-propanediol formed per 100 millimoles of glycerol consumed. The butyrate is the sole hydrocarbon coproduct detected in the aqueous phase and represents less than 7% of the molar quantity of glycerol consumed.

When fermentation starts with 65 g of glycerol/l, the maximum productivity of the conversion into 1,3-propanediol is 4.5 g/l/hr, and the length of the fermentation is 22 hours.

#### EXAMPLE 4

Production of 1,3-propanediol by Clostridium butyricum from industrial residues of agricultural or food processing origin containing glycerol

The microorganism is precultured for 24 hours in strictly anaerobic conditions at 37° C in penicillin flasks on the strongly buffered mineral medium (A) described in Example 3. These precultures are used to inoculate a medium of industrial origin having glycerol as the major organic compound. The medium comprises effluents from the distillation of alcohol of agricultural origin.

The industrially available coproducts are prepared for the fermentations shown hereinafter by the protocol comprising adjusting the glycerol content to between 14 and 15.8 g/l by diluting the medium and adding nutrient and saline components (1 g/l  $K_2HPO_4$ ; 0.5 g/l  $K_2HPO_4$  (sic); 2 g/l  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0.2 g/l  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 20 mg/l  $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 5 mg/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 1 g/l Yeast extract).

The anaerobic reactors containing 0.9 l of medium are autoclaved, cooled under nitrogen, and reduced by the addition of the reducer solution described in Example 1.

Inoculation is accomplished by 90 ml of bacterial suspension, and fermentation is conducted at a regulated pH 6.5 and 37° C.

TABLE II

Parameters of the conversion of natural origin glycerol  
by Clostridium butyricum (Strain I-1211)

Substrate origin	Residual water, Distillery No. 1 (red wine vinasse)	Residual water, Distillery No. 2 (white wine vinasse)
Initial glycerol concentration	15.8 g/l	14 g/l
Production of 1,3-propanediol	8.4 g/l	6.6 g/l
Molar yield mole of PPD produced/ mole of glycerol consumed	0.64	0.57

EXAMPLE 5

Production of 1,3-propanediol by a microbial population  
containing strains of Clostridium butyricum (Strain I-1211)  
or Enterobacter agglomerans (Strain I-1210) in an  
anaerobic digester of residual bioethanol distillery waters

The anaerobic, mixed, microbial flora was placed in a culture according to the protocol for preparing fermentations described in Example 3.

The fermentation medium in the anaerobic reactor included glycerol in various concentrations between 20 and 125% (weight/volume). The cultures developed at a pH between 5 and 8 at 37° C.

Figures 3a and 3b show the profile for glycerol conversion by the mixed anaerobic microbial flora in the digester.

Figure 3a is a diagram analogous to Figures 1 and 2. The right ordinates show the millimole quantities of glycerol and 1,3-propanediol formed. In Figure 3b, the axis of the left

ordinates shows the millimole quantities of gas ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ) formed, and on the right, the millimole quantities of products formed (1,3-propanediol and butyrate). The 1,3-propanediol is the principal product formed by the fermentation of glycerol by the anaerobic microbial population, with a very high degree of conversion of 66.7 millimoles of 1,3-propanediol formed from 100 millimoles of glycerol consumed. The maximum rate of 1,3-propanediol production (volume productivity) is 2.3 g/l/h for 11 hours of fermentation. The propanediol formed is not consumed and accumulates during the fermentation. The acetate and butyrate are formed in equal molar proportions during the phase of 1,3-propanediol production, representing respectively 7.4 and 6.6% (millimoles) of glycerol consumed. Carbon dioxide and hydrogen are the gaseous products formed.

The effects of pH conditions and glycerol content are illustrated in Figures 4 and 5, respectively.

Figure 4 shows the effect of pH on the molar yield from 1,3-propanediol production by the mixed, anaerobic, microbial flora defined in Example 5. The pH values are recorded as abscissae, and the molar yield of 1,3-propanediol, expressed in percent, as the ordinates.

Figure 5 shows the effect of glycerol concentration on the maximum rate of 1,3-propanediol production for the same mixed, anaerobic, microbial flora. This involves a diagram recording the glycerol quantities, expressed in g/l, as abscissae and the productivity of 1,3-propanediol formed, expressed in g/l/h, as ordinates.

From the standpoint of yield in converting glycerol into 1,3-propanediol, the most favorable pH is between 6.5 and 7 for a 66.7% yield (millimoles of propanediol formed per 100 millimoles of glycerol consumed). However, propanediol is produced up to pH 7.5 and up to pH 5, where the yield is still above 50%. At the kinetic level, the highest productivity is obtained at pH 6.5 with an initial glycerol concentration of 50 g/l producing 2.4 g of 1,3-propanediol per liter per hour.

## CLAIMS

1. Process for obtaining bacterially active products capable of converting glycerol into 1,3-propanediol, the said process comprising the steps of:

a) preculturing anaerobic populations stemming from anaerobic microbial habitats, the said preculture being accomplished in anaerobic conditions on a buffered nutrient medium containing glycerol as the sole source of carbon,

b) isolating active microbial precultures capable of fermenting glycerol,

c) enriching the said precultures by batch fermentation in an anaerobic reactor on a nutrient medium based on glycerol as the substrate and at a regulated pH, and

d) isolating bacterially active products capable of transforming glycerol into 1,3-propanediol.

2. Process according to Claim 1, characterized in that the anaerobic microbial habitats are agroindustry anaerobic digesters, such as distillery effluents, or anaerobic media, such as sediments and sludges from effluent collection sites.

3. Process according to one of Claims 1 or 2, characterized in that the pH is regulated to a value between 5 and 8, preferably between 6 and 7.5.

4. Process according to any of Claims 1 to 3, characterized in that the bacterial strains are isolated by starting with samples in anaerobiosis, diluting the populations, and spreading the populations in petri dishes on culture media containing agar in anaerobic conditions.

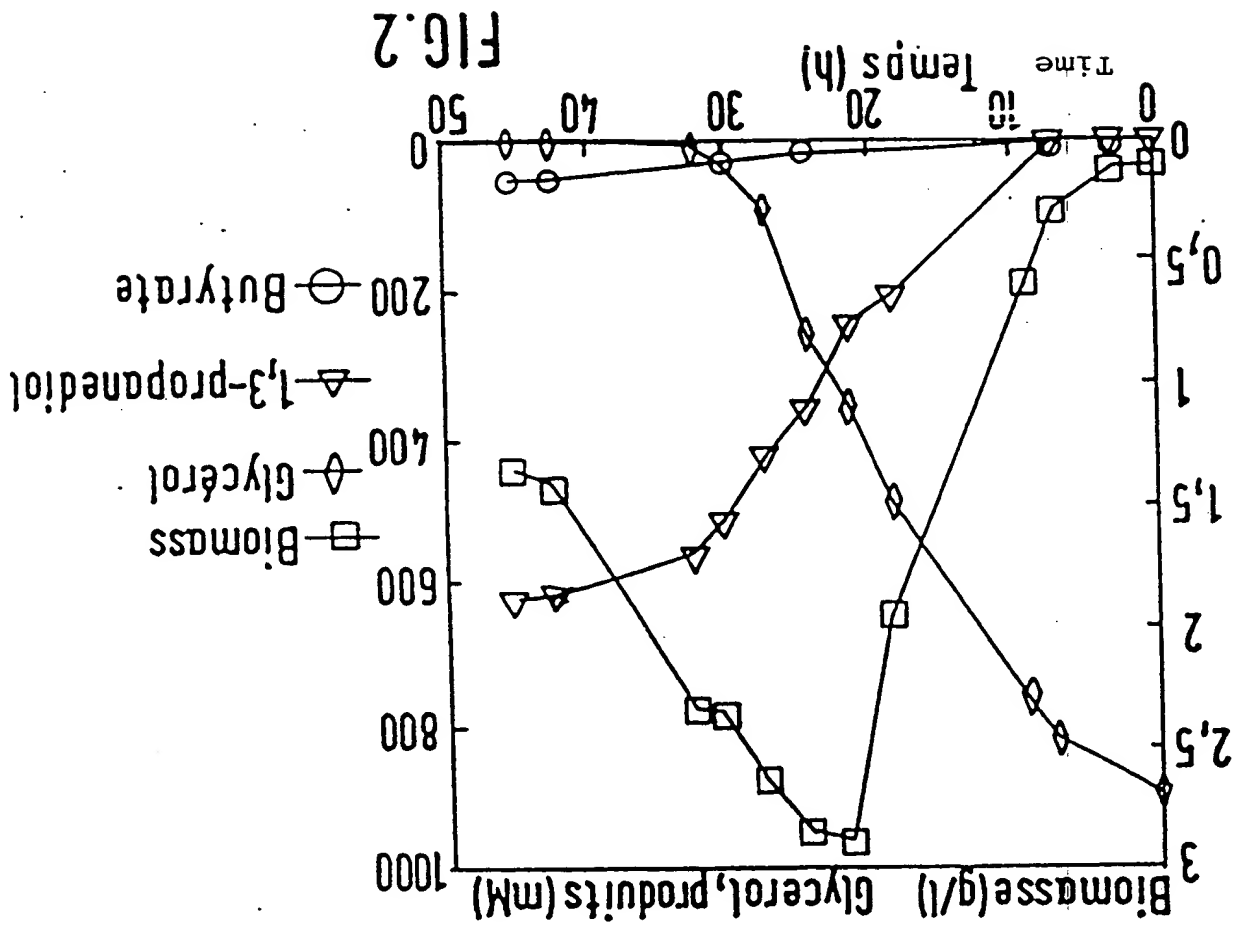
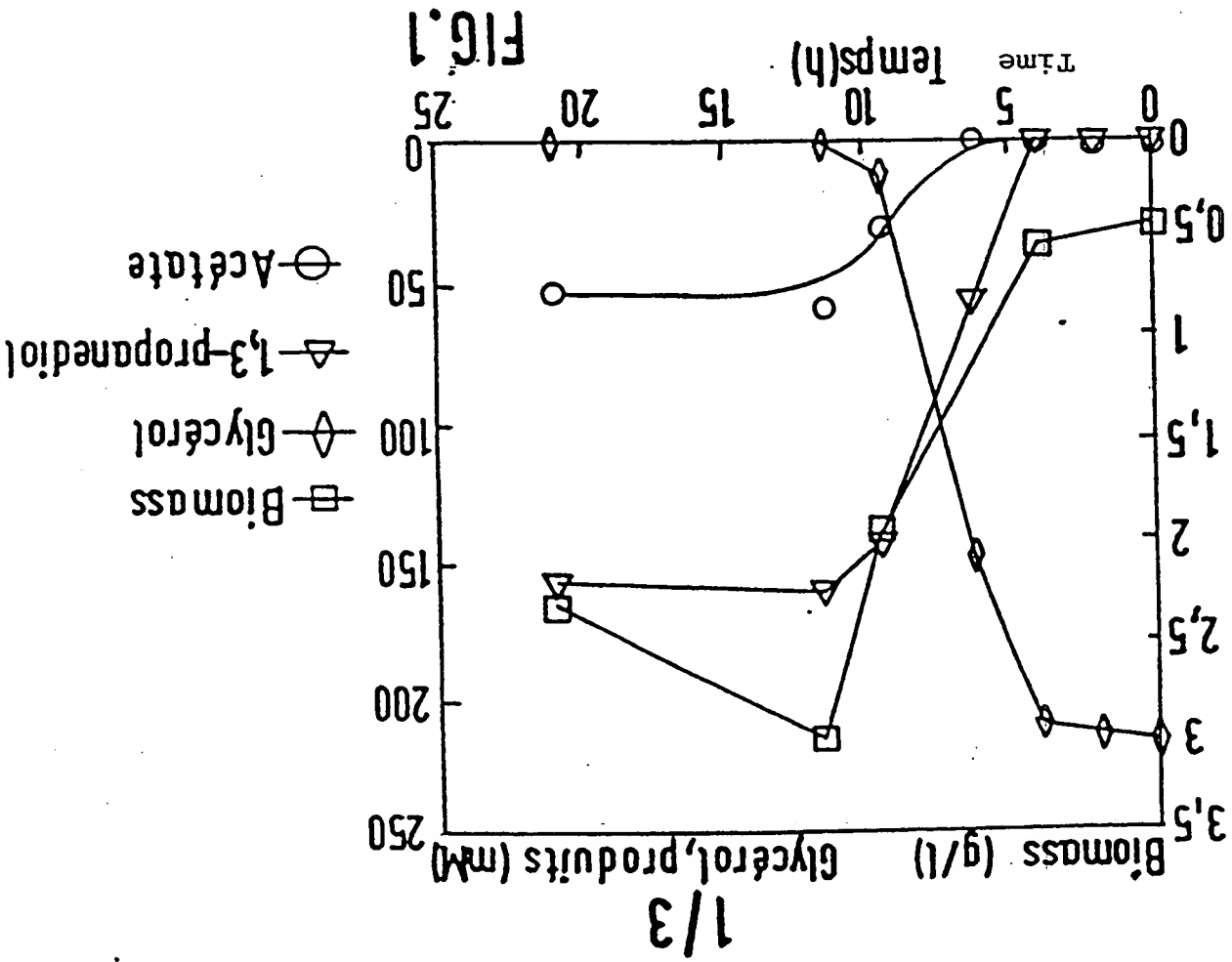
5. Bacterially active products capable of converting glycerol into 1,3-propanediol and obtainable by the process according to any of Claims 1 to 4.

6. Products according to Claim 5, including Enterobacter agglomerans, Clostridium butyricum, or Citrobacter amalonaticus, in the form of mixed cultures of anaerobic ecosystems.
7. Products according to one of Claims 5 or 6 comprising bacteria belonging to the Enterobacter agglomerans species.
8. Enterobacter agglomerans strain registered at the CNCM under No. I-1210.
9. Clostridium butyricum strain registered at the CNCM under No. I-1211.
10. Citrobacter amalonaticus strain registered at the CNCM under No. I-1212.
11. Use of products, species, and strains having bacterial activity according to any of Claims 5 to 9 to convert glycerol by fermentation into 1,3-propanediol.
12. Use according to Claim 11 of the Enterobacter agglomerans species, particularly the Enterobacter agglomerans strain I-1210, the conversion of glycerol into 1,3-propanediol being accomplished in a state of anaerobiosis with control and regulation of the pH between 6 and 7.5, preferably at 7, in a temperature range located between 28 and about 40° C.
13. Use according to Claim 11 of the Clostridium butyricum strain I-1211, the conversion of glycerol into 1,3-propanediol being accomplished in anaerobiosis with the pH regulated between 5 and 8, preferably between 6 and 7.5, at a temperature located between 32 and 40° C.
14. Use according to Claim 11 of a mixed, anaerobic, microbial flora, in particular a microbial population containing the Enterobacter agglomerans and Clostridium butyricum species and/or the Clostridium butyricum I-1211 and Enterobacter agglomerans I-1210 strains.



15. Use of bacterially active products according to Claim 5 comprising mixed bacterial populations that ferment glycerol and produce 1,3-propanediol, the said populations containing more particularly the Citrobacter amalonaticus I-1212 strain according to Claim 10.

Translated by Philip M. Levin, April 7, 1994.



2/3

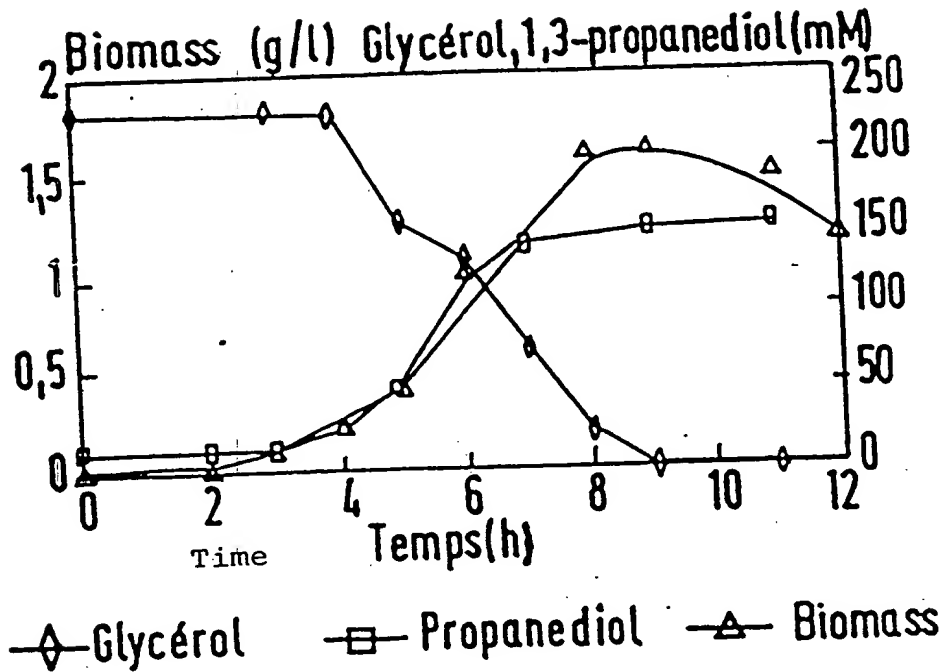


FIG.3a

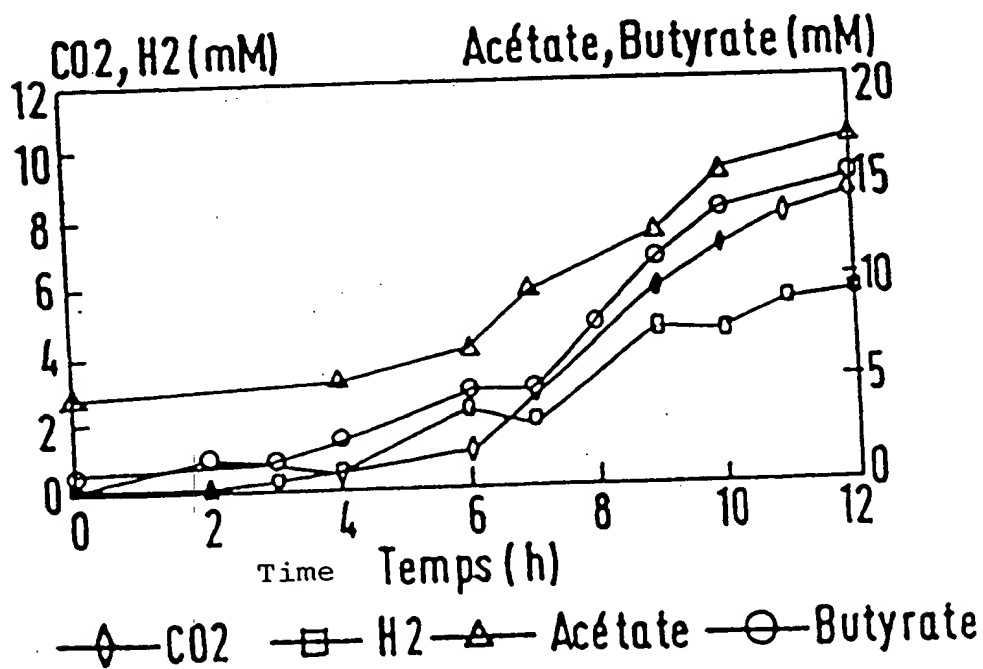
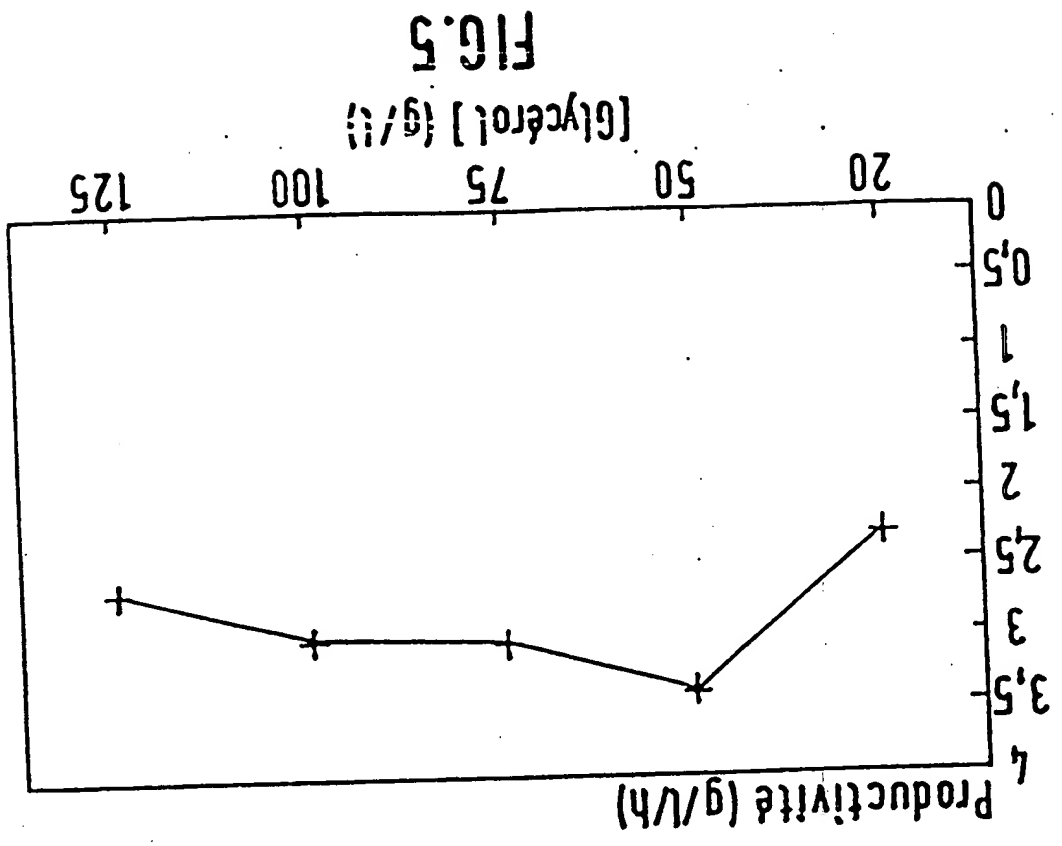
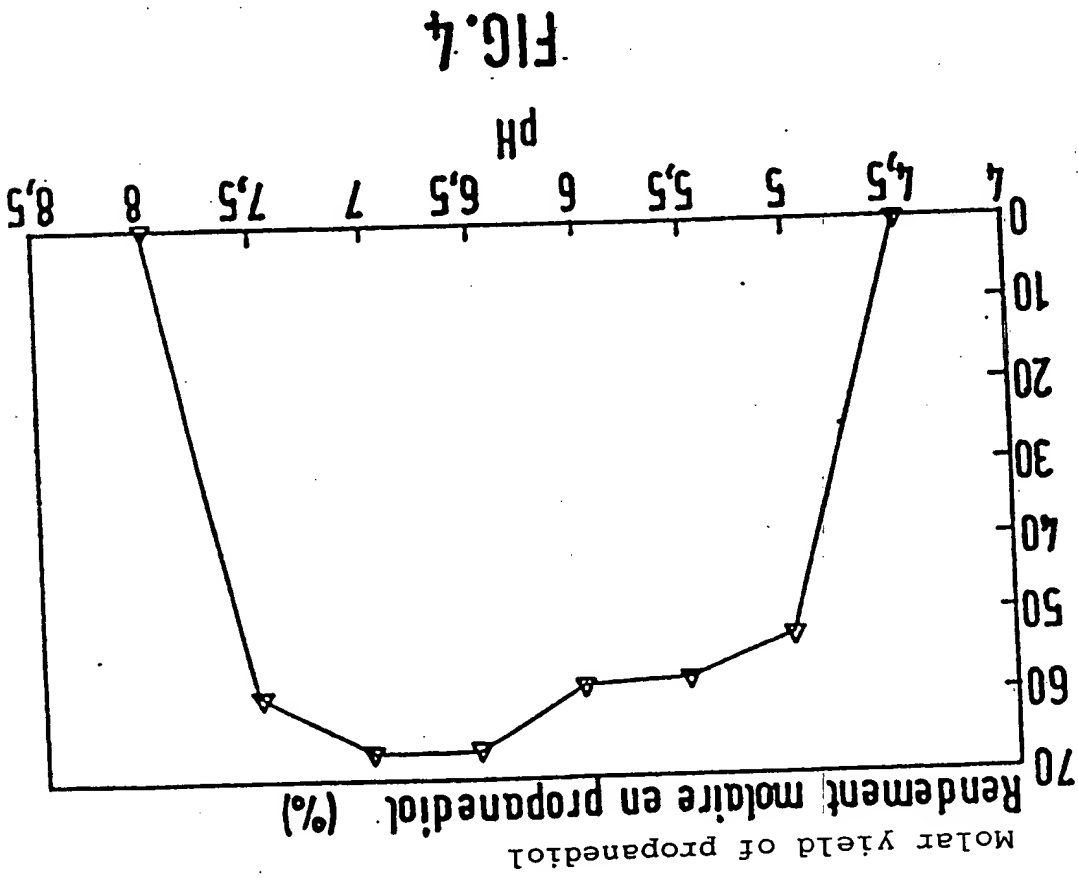


FIG.3b

3/3



**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC<sup>5</sup> : C12P 7/18;      //(C12P 7/18, C12R 1:01, C12R 1:145)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC<sup>5</sup> : C12P; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Vol. 36, No. 5, February 1992, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 592 - 597 H. BIEBL ET AL. "Glycerol conversion to 1, 3-propanediol by newly isolated clostridia." see abstract see page 593, column 1, paragraph 4 see page 596, column 1, last paragraph - page 597, column 1, last paragraph ---	1-3
A	APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY. Vol. 36, No. 3, December 1991, SPRINGER INTERNATIONAL. pages 289 - 294 B. GÜNZEL ET AL. "Fermentative production of 1,3-propanediol from glycerol by Clostridium butyricum up to a scale of 2m3." see the whole document --- ./.	1,9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 August 1993 (20.08.93)

Date of mailing of the international search report

14 September 1993 (14.09.93)

Name and mailing address of the ISA/  
European Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR93/00568

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>EP, A, 0361082 (HENKEL KOMMANDITGESELLSCHAFT AUF AKTIEN)  4 April 1990  (cited in the application)</p> <p>-----</p>	

FR 9300568  
SA 75451

20/08/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A-0361082	04-04-90	DE-A- 3829618	15-03-90
		DE-A- 3924423	31-01-91
		JP-A- 3065192	20-03-91

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**